

**PCT**ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>5</sup> :</b> <b>G01N 33/68, C07K 15/00</b>	<b>A1</b>	<b>(11) Numér de publication internationale: WO 94/15218</b> <b>(43) Date de publication internationale: 7 juillet 1994 (07.07.94)</b>
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR93/01299 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 23 décembre 1993 (23.12.93) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 92/15730 24 décembre 1992 (24.12.92) FR <b>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cédex 13 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> IOVANNA, Juan-Lucio [IT/FR]; 151, traverse de la Gouffonne, Bâtiment DI, F-13009 Marseille (FR). DAGORN, Jean-Charles [FR/FR]; 77, boulevard du Redon, Bâtiment H, F-13009 Marseille (FR). KEIM, Volker [DE/DE]; Kirsch Blütenstrasse 33, D-6805 Heddesheim (DE). SARLES, Jacques [FR/FR]; Chemin de la Mine, F-13420 Gemenos (FR). <b>(74) Mandataires:</b> GUTMANN, Ernest etc.; Ernest Gutmann-Yves Plasseraud S.A., 3, rue Chauveau-Lagarde, F-75008 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i>
<b>(54) Title: DETECTION OF CYSTIC FIBROSIS OR A CFTR GENE MUTATION</b> <b>(54) Titre: DETECTION DE LA MUCOVISCIDOSE OU D'UNE MUTATION DU GENE CFTR</b> <b>(57) Abstract</b> <p>A method for the <i>in vitro</i> detection of a pancreatic condition related to a CFTR gene alteration, wherein the concentration of human PAP in a biological sample is assayed. Antibodies suitable for carrying out the assay are also provided.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente demande concerne un procédé pour la détection <i>in vitro</i> d'une affection pancréatique associée à une altération du gène CFTR, caractérisé en ce que l'on dose la concentration de PAP humaine dans un échantillon biologique. Elle vise aussi des anticorps appropriés pour réaliser ce dosage.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande			UZ	Ouzbékistan

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Der Internationale No  
PCT/FR 93/01299

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	US,A,4 322 274 (G.B.WILSON ET AL.) 30 Mars 1982  voir le document en entier ---	1,4-8, 14,15, 17-20
A	PEDIATRIC PULMONOLOGY vol. 7 , 1991 pages 11 - 18 P.M.FARRELL ET AL. 'Current Issues in Neonatal Screening for Cystic Fibrosis and Implications of the CF Gene Discovery.' cité dans la demande voir le document en entier ---	1
A	WO,A,91 02796 (HSC RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 7 Mars 1991 voir page 1 - page 10 ---	1
A	EP,A,0 446 017 (GENZYME CORPORATION) 11 Septembre 1991 voir page 2 - page 3 -----	1

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 93/01299

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9116428	31-10-91	FR-A- 2661187 EP-A- 0528932	25-10-91 03-03-93
US-A-4322274	30-03-82	AUCUN	
WO-A-9102796	07-03-91	AU-A- 6161690 CA-A- 2066204 EP-A- 0489058 JP-T- 5500306 US-A- 5240846	03-04-91 23-02-91 10-06-92 28-01-93 31-08-93
EP-A-0446017	11-09-91	AUCUN	

## DETECTION DE LA MUCOVISCIDOSE OU D'UNE MUTATION DU GENE CFTR

La présente demande a pour objet la détection de la mucoviscidose ou d'une mutation du gène responsable de la mucoviscidose associée à une affection pancréatique, au moyen d'un dosage de la PAP (Pancreatitis-Associated Protein)

La PAP a été isolée, purifiée et caractérisée chez l'homme et décrite dans la demande de brevet PCT publiée le 31 Octobre 1991 sous le n° 91/16428. Dans cette demande antérieure, la PAP a été proposée comme moyen de détection d'une pathologie déterminée, la pancréatite aiguë.

Les inventeurs ont à ce jour mis en évidence que des anomalies génétiques susceptibles de donner lieu à des affections caractéristiques de la mucoviscidose, peuvent être corrélées de façon fiable chez l'homme, avec une expression anormale de la PAP et ce dès la naissance.

La mucoviscidose, encore appelée "cystic fibrosis" en anglais est une maladie génétique très fréquente chez certaines populations, qui se caractérise par une insuffisance globale des sécrétions exocrines du pancréas et du poumon et d'une manière générale, des glandes exocrines. Cliniquement, la maladie est associée à des sécrétions trop visqueuses, le mucus formé pouvant obstruer les bronches et provoquer des troubles graves ou mortels.

Le gène de la mucoviscidose a été localisé sur le chromosome 7 humain. Ce gène, appelé gène CFTR ("cystic fibrosis transmembrane conductance regulator") présente des mutations dans différentes régions, chez les sujets atteints de mucoviscidose. Des mutations du même type

peuvent être détectées sur un seul des deux chromosomes 7, chez des sujets dits "porteurs" mais ne présentant pas de signes cliniques de la maladie. Ces personnes sont hétérozygotes pour la mutation du gène CFTR.

Dans le cas d'une mutation hétérozygote, le sujet porteur peut toutefois souffrir de certains troubles caractéristiques d'une altération des glandes sécrétoires. Le sujet porteur peut par exemple être atteint de troubles au niveau du pancréas.

Le diagnostic de la mucoviscidose a en premier lieu été effectué par un test appelé "test à la sueur" consistant à doser le chlore et le sodium dans la sueur de sujets en particulier d'enfants susceptibles d'être atteints par cette maladie. L'indication d'un taux de chlore situé entre 60 et 180 mEq/l pouvait être corrélée avec la maladie, dans la mesure où ce taux est d'environ 40 mEq/l chez le nourrisson normal.

Plusieurs tests d'un autre type ont été successivement proposés (Berry, H.K. et al, Am.J.Dis.Child. 1980 134:930 ; Crossley, J.R., et al, Lancet 1977 ii:1093 ; Forrest, D.C., et al Arch.Dis.Child. 1981 56:156 ; Green, M.N. et al, Pediatrics 1968 41:989 ; Robinson, P.G. et al Arch.Dis.Child. 1976 51:301 ; Shwachman, H., et al, Pediatrics 1949 4:222), mais seul le dosage sérique de trypsine chez le nouveau-né (Farriaux, J.P., et al, Immunoanal.Biol.Spéc. 1992 33:71) a démontré suffisamment d'intérêt pour être encore en vigueur dans certains pays (Farrell, P.M., et al, Ped.Pulmonol. 1991 Supplement 7:11). Ce dosage radioimmunologique est réalisé sur des taches de sang déposé sur carton, prélevé chez les nouveau-nés aux fins de dépistage des autres maladies génétiques actuellement dépistées systématiquement, la phénylcétonurie et l'hypothyroïdisme. Le dépistage par la trypsine sérique

reste cependant très imparfait puisque les résultats d'un programme français d'évaluation à grande échelle ont récemment amené l'Association Française de Dépistage à ne pas le rendre obligatoire (Farriaux, J.P., et al, Immunoanal.Biol.Spéc. 1992 33:71).

Le principal problème posé par le dosage sérique de trypsine est celui des faux-positifs (environ 1 % de la population alors que l'incidence de la maladie est en France d'environ 0.03 %, (Farriaux, J.P., et al, Immunoanal.Biol.Spéc. 1992 33:71).

L'invention propose de nouveaux moyens pour réaliser un test de détection de la mucoviscidose ou d'une affection de certaines glandes exocrines, en particulier du pancréas, affection liée à l'existence d'une mutation hétérozygote du gène CFTR.

Les moyens de l'invention permettent de remédier de façon significative aux inconvénients présentés par les tests connus jusqu'à présent, et en particulier ces moyens offrent la possibilité de diminuer considérablement voire d'abolir statistiquement le nombre de résultats faux positifs.

La possibilité de détecter la mucoviscidose ou une affection pancréatique résultant d'une mutation du gène CFTR, grâce à la recherche de la PAP, a permis la mise au point d'un test suceptible d'être appliqué lors d'un dépistage néonatal ou lors d'un dépistage chez l'enfant ou chez l'adulte de la mucoviscidose.

Ce test peut également être réalisé dans le but de suivre l'évolution de la maladie par exemple pour déterminer l'évolution de l'affection pancréatique.

Un tel test peut également être mis en oeuvre pour détecter la présence d'un gène CFTR muté hétérozygote ne conduisant pas à l'apparition d'une mucoviscidose mais susceptible d'être corrélée à une affection du pancréas, chez un patient adulte ou enfant.

L'invention a donc pour objet un procédé pour la détection in vitro d'une affection pancréatique associée à une altération du gène CFTR, caractérisé en ce que l'on dose la concentration de PAP humaine dans un échantillon biologique.

L'invention concerne également un procédé pour la détection in vitro sur un échantillon biologique de la mucoviscidose, caractérisé en ce que l'on dose la concentration de PAP.

La valeur de la concentration obtenue peut ensuite être comparée à une valeur qui serait obtenue dans les mêmes conditions de test, en l'absence de toute pathologie ou en l'absence de mutation hétérozygote du gène CFTR.

Les inventeurs ont constaté que dans une pathologie telle que la mucoviscidose, qui n'est pas nécessairement associée, notamment chez le nourrisson, à une pancréatite aiguë même dans le cas d'une insuffisance pancréatique, on remarque une augmentation significative, voire considérable du taux de PAP par rapport au taux normal. Cette augmentation peut être de 2 à 3 fois par rapport à la valeur normale, jusqu'à 100 fois cette valeur. La valeur normale est déterminée par référence à la médiane telle que définie ci-après.

Le dosage proposé de la concentration en PAP dans un échantillon biologique, comme indication d'une altération du gène CFTR associée à une affection pancréatique ou d'une mucoviscidose, présente l'avantage d'être utilisable dans le cadre du diagnostic néonatal.

Malgré le phénomène connu et non pathologique de passage transitoire dans le sang de certaines enzymes au moment de la naissance, le dosage de la PAP reste en effet statistiquement fiable pour détecter la mucoviscidose ou une mutation hétérozygote sur le gène



CFTR associée à une affection pancréatique. En d'autres termes, lorsque le taux de PAP mesuré dans un échantillon biologique, et en particulier dans le sang, lors d'un test néonatal est anormal, on peut en déduire une anomalie du gène CFTR, associée à la mucoviscidose ou dans certains cas à une altération pancréatique. Les inventeurs ont donc constaté que la présence d'un taux anormalement élevé de PAP dans le sang, lors d'un test néonatal ne peut être confondue avec la sécrétion des enzymes dans le sang qui peut accompagner le phénomène de "stress périnatal".

Par l'expression "taux anormalement élevé" de PAP on entend une valeur de la PAP par exemple supérieure à deux fois la valeur de la médiane calculée à partir du taux de PAP déterminé sur un groupe d'échantillons de référence.

Selon un premier mode de réalisation de l'invention, le procédé de détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une mutation hétérozygote pour le gène CFTR accompagnée d'une affection pancréatique, est caractérisé par :

- le dosage de la concentration de PAP dans l'échantillon biologique,
- la comparaison de la valeur obtenue, avec la valeur de la médiane, calculée pour un groupe déterminé d'échantillons de référence préalablement soumis au dosage de la PAP, dans les mêmes conditions.

Par "groupe d'échantillons de référence", on entend de préférence des échantillons obtenus chez des patients non homozygotes pour la mutation du gène CFTR.

La médiane dont il est question précédemment est la valeur de la mesure obtenue pour un échantillon donné et choisie de telle façon qu'il existe un nombre égal d'observations (mesures) inférieures et supérieures à cette valeur dans le groupe déterminé

d'échantillons testés. Lorsque le nombre de mesures effectuées est pair, la médiane est indéterminée entre les deux valeurs centrales observées.

Un procédé avantageux de réalisation de l'invention est encore caractérisé en ce que le dosage de la concentration sérique de PAP comprend :

- la mise en contact d'un échantillon biologique, par exemple le sang ou le sérum, avec des anticorps reconnaissant la PAP humaine,
- la détection de la formation d'une réaction immunologique de type PAP-anticorps,
- le dosage des complexes PAP-anticorps.

Les anticorps utilisés pour la réalisation de ce dosage peuvent être des anticorps polyclonaux ou monoclonaux, voire ces deux types d'anticorps lorsque le test est un test immunologique de type sandwich.

De préférence, l'anticorps formant le complexe immunologique avec la PAP est un anticorps monoclonal. Avantageusement, il s'agit d'un anticorps monoclonal spécifique de la PAP humaine qui est par conséquent dépourvu de réaction immunologique avec les constituants présents dans l'échantillon biologique normal et en particulier dans le sang normal de référence ; cet anticorps est notamment dépourvu de réaction avec les lectines du sang.

On appelle "sang normal" ou "échantillon normal", un échantillon contenant un taux très faible de PAP.

On aura intérêt dans le cadre de la réalisation du test de détection in vitro de l'invention à sélectionner un anticorps ou des anticorps spécifiques de la PAP donnant lieu à un signal de bruit de fond faible (mesurable en mettant en contact un sérum normal ou un échantillon normal avec cet anticorps).

Un procédé particulièrement avantageux pour la réalisation de l'invention est caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une quantité déterminée d'un échantillon biologique, par exemple d'un échantillon de sang ou de sérum dans lequel on recherche la PAP, avec un anticorps monoclonal (dit "anticorps de capture") reconnaissant spécifiquement la PAP humaine, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre l'anticorps de capture et la PAP lorsqu'elle est présente dans l'échantillon dosé,

- la mise en contact du milieu de réaction obtenu à l'étape précédente, avec un anticorps monoclonal (dit "anticorps de révélation") reconnaissant un épitope différent de l'épitope reconnu par l'anticorps de capture, l'anticorps de révélation étant marqué, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre l'anticorps de révélation et l'antigène préalablement lié à l'anticorps de capture,

- le lavage pour éliminer les anticorps de révélation n'ayant pas réagi,

- la détection des complexes anticorps de capture - antigène PAP - anticorps de révélation,

- la détermination de la concentration de PAP, et le cas échéant sa comparaison avec une médiane calculée pour un groupe déterminé d'échantillons de référence préalablement soumis au même dosage de la PAP dans les mêmes conditions.

Pour la réalisation du procédé ci-dessus décrit, on pourra mettre en oeuvre un couple anticorps de capture/anticorps de révélation dans lequel l'anticorps de capture sera un sérum polyclonal et l'anticorps de révélation sera un anticorps monoclonal. On peut également utiliser un couple anticorps de

capture/anticorps de révélation dans lequel tous les anticorps sont monoclonaux, étant entendu que l'anticorps de capture et l'anticorps de révélation reconnaissent des épitopes distincts sur la PAP.

Des résultats tout à fait satisfaisants peuvent aussi être obtenus lorsque l'anticorps de capture est un sérum polyclonal et l'anticorps de révélation est également un sérum polyclonal, de même nature et le cas échéant de même origine s'agissant de sa préparation, ce dernier étant toutefois marqué.

Afin de réaliser le test ELISA de type sandwich ci-dessus décrit pour la PAP, une sélection des anticorps monoclonaux et/ou de sérums polyclonaux doit être faite, sachant que l'anticorps de capture est destiné à revêtir des puits de plaque de microtitration.

L'homme du métier tiendra compte dans la sélection de ces anticorps, du fait que l'absorption d'un anticorps sur un support solide peut conduire à une perte d'activité à des modifications conformationnelles de la molécule. Ainsi il pourra être nécessaire de vérifier dans un premier temps que l'anticorps choisi ou le sérum choisi est capable de reconnaître la PAP naturelle et/ou la PAP recombinante après avoir été fixé sur un support.

L'homme du métier sera également en mesure de sélectionner un anticorps monoclonal de révélation reconnaissant un épitope différent sur la PAP par rapport à l'épitope reconnu par l'anticorps de capture en réalisant par exemple un test de détection de la PAP par compétition entre les deux anticorps choisis.

De façon générale, le couple anticorps de capture/anticorps de révélation ou le sérum polyclonal utilisé, tant pour la capture que la révélation, doit présenter une sensibilité satisfaisante ainsi que

permettre une reproductibilité des résultats intéressante et une bonne stabilité dans le temps (d'environ 6 mois pour un stockage des anticorps à 4°C).

Ainsi on mettra avantageusement en oeuvre un anticorps monoclonal de capture désigné 6F3E4, produit par l'hybridome déposé à l'ECACC (European Collection of Animal Cell Culture, Porton Down, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, Grande Bretagne) sous le n° 92122310 le 23 Décembre 1992. De même, un anticorps de révélation particulièrement intéressant est l'anticorps 16F4B8 produit par l'hybridome déposé à l'ECACC sous le n° 92122309 le 23 Décembre 1992.

L'anticorps ou le sérum polyclonal de révélation sera marqué avec tout marqueur approprié afin de permettre la détection du complexe anticorps de capture - antigène PAP - anticorps de révélation formé lors du test de détection. A titre indicatif, on pourra utiliser des marqueurs radioactifs ou encore des marqueurs enzymatiques. A titre d'exemple, on citera le marquage à l'aide de la peroxidase de Raifort.

Le procédé de détection dont question ci-dessus faisant appel à des anticorps, peut être modifié de telle façon que l'anticorps de capture et/ou l'anticorps de révélation sont remplacés par leurs fragments variables ou une partie de ces fragments variables. A titre d'exemple, on peut utiliser pour réaliser la réaction des fragments  $F(ab')_2$  ou Fab.

L'invention concerne par ailleurs un anticorps monoclonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît la PAP humaine naturelle purifiée et/ou recombinante, lorsqu'il est adsorbé sur un support solide.

La PAP a été décrite dans la demande PCT précitée ; sa séquence nucléotidique et sa séquence en acides aminés sont rappelées à la figure 3.

Des anticorps avantageux répondant à ces conditions sont les anticorps 6F3E4 ou 16F4B8 décrits ci-dessus.

L'invention a enfin pour objet un kit comprenant au moins deux anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre des épitopes différents de la PAP humaine, l'un au moins des deux anticorps (anticorps de capture) monoclonaux reconnaissant la PAP humaine lorsqu'il est fixé sur un support solide.

De manière générale, l'invention vise l'utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la PAP humaine, pour la détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une affection pancréatique liée à une mutation hétérozygote pour le gène CFTR.

Entre également dans le cadre de l'invention, un kit pour la détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une affection pancréatique associée à une mutation hétérozygote pour le gène CFTR comprenant :

- des anticorps monoclonaux décrits et/ou polyclonaux ci-dessus, l'un de ces anticorps (anticorps de révélation) étant marqué,
- un réactif permettant de révéler l'anticorps de révélation,
- un témoin négatif.

Un kit préféré pour la réalisation de l'invention comprend à titre d'anticorps de capture, l'anticorps 6F3E4 et à titre d'anticorps de révélation, l'anticorps 16F4B8.

Un autre kit particulièrement intéressant contient pour la détection de la PAP, un sérum polyclonal. Une partie de ce sérum est destinée à la capture de la PAP, l'autre partie contient des anticorps marqués pour la révélation dans un test de type sandwich, de la présence d'un complexe de type PAP-anticorps.

Les sérums polyclonaux appropriés peuvent être préparés chez des animaux, par exemple des lapins, auxquels on a administré la PAP purifiée.

Un kit intéressant comprend ainsi :

- un sérum polyclonal reconnaissant la PAP humaine,
- le cas échéant un sérum polyclonal reconnaissant la PAP humaine, dont les anticorps sont marqués,
- un réactif permettant de révéler les anticorps marqués,
- un témoin négatif.

L'invention vise aussi l'hybridome producteur de l'anticorps 6F3E4, ayant le n° 92122310 à l'ECACC, ainsi que l'hybridome producteur de l'anticorps 16F4B8, ayant le n°92122309 à l'ECACC.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention apparaissent dans les exemples et dans les figures qui suivent.

#### Figure 1.

Résultat d'un dosage de PAP sérique au moyen d'un test de type ELISA compétitif faisant appel à des anticorps polyclonaux obtenus chez le lapin et reconnaissant la PAP humaine purifiée. Ce dosage a été réalisé chez des patients atteints de mucoviscidose.

#### Figure 2.

Dosage de PAP chez le nouveau-né.

#### Figure 3.

Séquence de nucléotides et d'acides aminés de la PAP humaine.

### A/ DOSAGE EXPERIMENTAL

#### **1. Dosage de PAP chez des patients atteints de mucoviscidose :**

**Protocole :** Des prélèvements sanguins ont été analysés chez 66 patients âgés de 15 jours à 40 ans, chez qui le diagnostic de mucoviscidose avait été confirmé par le test à la sueur (Shwachman, H. et al, Ann.N.Y.Acad.Sci. 1962 93:600) et/ou l'analyse génétique (Collins, F.S. Cystic fibrosis : Molecular biology and therapeutic implications. Science 1992 256:774). Une série d'individus sains d'âge correspondant a été étudiée en parallèle. La PAP a été dosée dans ces prélèvements, en utilisant le dosage suivant :

**Dosage de PAP sérique :** Ce dosage, de type ELISA compétitif, utilise des anticorps polyclonaux obtenus chez le lapin par injections répétées de PAP humaine purifiée (Keim, V. et al, Gastroenterology 1992 103:248). Des protéines de suc pancréatique humain contenant de la PAP ont été adsorbées sur plaques de microtitration (100 ng de protéines par puits). L'échantillon de sérum (50  $\mu$ l) est mis dans un tube de type Eppendorf en présence de 0,5  $\mu$ l de sérum immun et incubé dans un volume final de 100  $\mu$ l de Tris 100 mM pH 7,4, 1 % Tween 20, 1,5 % albumine sérique bovine, pendant 2 h à température ambiante. Le mélange est ensuite déposé dans un puits de microtitration traité comme décrit ci-dessus et incubé pendant 2 h à température ambiante. Le puits est alors rincé trois fois avec 300  $\mu$ l de PBS contenant 0,5 % de Tween 20. La révélation se fait à l'aide d'un anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de lapin, marqué à la peroxydase



(100  $\mu$ l à 0,2  $\mu$ g/ml). La courbe de référence est établie à l'aide de PAP purifiée.

**Résultats :** Les résultats présentés à la Figure 1 montrent

- \* que chez les patients atteints de mucoviscidose la concentration sérique de PAP est toujours supérieure à celle des témoins. Les valeurs des témoins s'échelonnent entre 1 et 10 ng/ml, celles des patients entre 11 et 1900 ng/ml.

- \* que les valeurs les plus élevées sont observées chez les patients les plus jeunes.

**2. Dosage de PAP chez les nouveau-nés :** L'analyse anatomo-pathologique de foetus atteints de mucoviscidose a montré dans tous les cas une atteinte pancréatique (Boué A et al, Hum. Genet. 1988, 74:288). Les inventeurs en ont déduit que la concentration de PAP pouvait déjà être élevée dans le sang des nouveau-nés atteints de mucoviscidose.

**Protocole :** Ceci a pu être démontré par l'expérimentation suivante :

Le dosage de PAP a été réalisé à partir de cartons provenant de centres de dépistage, portant des échantillons de sang séché. Les cartons correspondaient à quatre groupes d'individus :

Groupe 1 : Témoins (trypsine normale à la naissance) (n = 50).

Groupes 2, 3 et 4 : Enfants présentant une trypsine élevée à la naissance.

Groupe 2 : Enfants "faux-positifs" (pas d'anomalie du gène CFTR, test à la sueur négatif). (n = 60)

Groupe 3 : Enfants hétérozygotes pour le gène CFTR muté (non atteints), test à la sueur négatif. (n = 33)

Groupe 4 : Enfants atteints de mucoviscidose (homozygotes pour le gène CFTR muté, test à la sueur positif) (n = 11).

**Dosage :** Le dosage a été réalisé de la manière suivante :

Les dépôts de sang sur les cartons utilisés dataient de moins de deux mois. Les cartons correspondaient aux normes définies par l'Association Française de Dépistage.

Un disque de 6 mm de diamètre a été découpé dans chaque carton, au niveau de la tache de sang. La quantité de sang correspondante est d'environ 10  $\mu$ l.

Chaque disque a été déposé dans un tube de type Eppendorf de 1,5 ml de volume total, contenant 150  $\mu$ l d'une solution de Tris 100 mM, pH 7,4, 1 % Tween 20, 1,5 % albumine sérique bovine et soumis à agitation sur un appareil Multivortexer (Amersham France S.A.) pendant 8 h. à température ambiante. La totalité de la solution contenant le sang désorbé est ajoutée à 50  $\mu$ l de solution de Tris pH 7,4, 1 % Tween 20, 1,5 % albumine sérique bovine contenant 0,5  $\mu$ l d'antisérum anti-PAP (volume total 200  $\mu$ l) et incubée pendant 2 h à température ambiante. La suite du dosage est réalisée exactement comme décrit ci-dessus.

**Résultats :** Les résultats, présentés dans la Figure 2, peuvent être résumés comme suit :

- 1) Les enfants ayant une trypsine négative (Témoins, Groupe 1) ont une concentration de PAP sérique comprise entre 0,01 et 0,1 ng/10  $\mu$ l de sang (médiane 0,065).
- 2) Les enfants du Groupe 2 (Trypsine positive mais non atteints) présentent les mêmes valeurs que les témoins.

3) Un tiers (11/33) des enfants du groupe 3 (Hétérozygotes) ont présenté une concentration sérique de PAP allant de 0,18 à 0,75 ng/10  $\mu$ l de sang.

4) Tous les enfants atteints de mucoviscidose (11/11) ont présenté une concentration sérique de PAP comprise entre 0,22 et 0,90 ng/10  $\mu$ l de sang.

#### **Conclusion :**

1) Aucun enfant témoin n'a présenté une concentration sanguine de PAP supérieure à 0,1 ng/10  $\mu$ l de sang. Cette expérience montre que toute valeur supérieure à 2 fois la médiane (supérieure à 0,11 ng/10  $\mu$ l de sang) est anormale.

2) D'ailleurs, tous les enfants atteints de mucoviscidose ont montré des valeurs de PAP dans le sang supérieures à ce seuil.

3) Contrairement au système basé sur le dosage de trypsine, le dosage de PAP semble ne sélectionner que les enfants ayant une mucoviscidose et ceux, parmi les hétérozygotes pour le gène altéré, dont l'atteinte pancréatique est la plus prononcée.

Le test proposé présente donc les qualités requises pour son application au dépistage néonatal de la mucoviscidose.

#### **B/ DOSAGE INDUSTRIEL**

##### **1. A l'aide d'anticorps monoclonaux**

La mise au point d'un test ELISA de type "sandwich" pour la PAP a nécessité de sélectionner deux anticorps monoclonaux, reconnaissant deux épitopes différents sur l'antigène :

. l'un destiné à revêtir les puits de plaques de microtitration (anticorps de capture),

. l'autre, couplé à un enzyme, destiné à révéler l'antigène adsorbé sur les puits (anticorps de révélation).

Cette sélection a été réalisée avec des anticorps monoclonaux produits en ascites et purifiés par chromatographie d'affinité sur colonne de protéine-A Sépharose pour les IgG ou sur colonne d'immunoabsorbant pour les IgM (anticorps monoclonal de rat anti-IgM de souris couplé à une matrice de Sépharose).

L'adsorption d'une immunoglobuline sur un support solide se traduit par des modifications conformationnelles qui peuvent entraîner une perte d'activité de la molécule. Tous les anticorps monoclonaux anti-PAP obtenus dans le laboratoire ont donc, dans un premier temps, été testés pour leur capacité, après adsorption sur des plaques de microtitration (NUNC maxisorp), à reconnaître la PAP naturelle et recombinante. Après incubation, les complexes antigène-anticorps ont été révélés à l'aide de fragments Fab d'immunoglobulines de lapin anti-PAP conjugués à la peroxydase en utilisant comme substrat de l'enzyme de l'o-phenylènediamine.

Toutes les immunoglobulines ayant conservé cette capacité ont été retenues comme anticorps potentiels de capture et couplées à de la biotine.

Ces anticorps biotinylés ont été utilisés en tests de compétition pour sélectionner un anticorps monoclonal de révélation.

Ces tests ont été réalisés avec de la PAP (naturelle et recombinante) adsorbée sur des puits de plaques de microtitration revêtus d'IgG de lapin anti-PAP. La fixation des anticorps monoclonaux biotinylés sur l'antigène (révélée à l'aide d'un complexe avidine-POD) a été mesurée en absence ou en présence

d'un excès des différents anticorps monoclonaux à tester.

Tous les anticorps monoclonaux n'entrant pas en compétition avec au moins un des anticorps biotinylés (et reconnaissant donc un épitope différent), ont été sélectionnés comme anticorps potentiels de révélation.

Ils ont ensuite été couplés à la POD sous forme de fragment Fab' avant d'être utilisés pour la mise au point de la forme finale du test ELISA de dosage de la PAP.

Cette mise au point a nécessité de rechercher le couple anticorps de capture-anticorps de révélation qui permette d'obtenir la meilleure sensibilité du test, la meilleure reproductibilité des résultats et la meilleure stabilité des réactifs dans le temps.

Deux anticorps monoclonaux ont répondu à l'ensemble de ces critères de sélection:

- . l'anticorps 6F3E4 utilisé en capture,
- . l'anticorps 16F4B8 utilisé en révélation.

## 2. A l'aide de sérums polyclonaux

Un dosage ELISA PAP de type sandwich adapté aux conditions de dépistage a été mis au point. Ses caractéristiques sont les suivantes :

### Production des anticorps :

L'antigène était de la PAP humaine hautement purifiée, selon la technique suivante : à partir de suc de pancréas transplanté, lyophilisé, une première séparation par chromatographie d'échange d'ions (HPLC, colonne MonoS) a permis de séparer un pic contenant la PAP et un contaminant de haut poids moléculaire. Ce pic a ensuite été résolu par tamisage moléculaire (HPLC, colonne Sephacryl 200 HR). La PAP a alors été recueillie sous forme d'une fraction homogène. Le

contrôle réalisé par électrophorèse en gel SDS et coloration à l'argent a permis de garantir une pureté supérieure à 98 %.

L'immunisation a été réalisée selon la technique habituelle du laboratoire, décrite par Keim V. et al (Gastroenterology, 1992, 103:248).

La qualité des immunsérums a été testée par utilisation en Western blots de dilutions successives.

Construction de l'ELISA :

Il s'agit d'un ELISA sandwich polyclonal/polyclonal.

Les immunoglobulines de l'immunsérum ont été purifiées par affinité sur colonne de protéine A-Sépharose.

Les immunoglobulines destinées à la révélation ont été marquées à la biotine selon la technique habituelle connue de l'homme du métier. Le système de révélation faisait intervenir l'avidine POD.

La sensibilité du test est de 50 pg/ml.

Résultats obtenus :

Quarante prélèvements sur carton de nouveau-nés sains ont été testés. Les concentrations de PAP y étaient toutes inférieures à 60 pg/ml. Un nouveau né atteint de mucoviscidose avait une valeur de 800 pg/ml. Six enfants (âge 3 mois-10 ans) atteints de la maladie, dont le sang a été aussi prélevé sur carton, ont montré des valeurs s'échelonnant entre 0,5 ng/ml et 1,8 ng/ml.

Ces résultats confirment les différences déjà observées avec le dosage réalisé avec les anticorps monoclonaux.

### REVENDICATIONS

1. Procédé pour la détection in vitro d'une affection pancréatique associée à une altération du gène CFTR, caractérisé en ce que l'on dose la concentration de PAP humaine dans un échantillon biologique.

2. Procédé selon la revendication 1 pour la détection in vitro sur un échantillon biologique de la mucoviscidose, caractérisé en ce que l'on dose la concentration de PAP.

3. Procédé de détection selon l'une quelconque des revendications 1 et 2, caractérisé en ce que la détection de la mucoviscidose est réalisée lors d'un test néonatal.

4. Procédé de détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une affection pancréatique liée à une mutation hétérozygote pour le gène CFTR selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé par :

- le dosage de la concentration de PAP dans l'échantillon biologique,
- la comparaison de la valeur obtenue, avec la valeur de la médiane calculée pour un groupe déterminé d'échantillons de référence préalablement soumis au dosage de la PAP, dans les mêmes conditions.

5. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que le dosage de la concentration sérique de PAP comprend :

- la mise en contact d'un échantillon biologique, par exemple le sang ou le sérum, avec des anticorps reconnaissant la PAP humaine,
- la détection de la formation d'une réaction immunologique de type PAP-anticorps,
- le dosage des complexes PAP-anticorps.

6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce que les anticorps sont des anticorps monoclonaux.

7. Procédé selon la revendication 6 caractérisé en ce que les anticorps monoclonaux sont spécifiques de la PAP humaine et sont par conséquent dépourvus de réaction immunologique avec les constituants présents dans le sang normal ou dans un échantillon biologique normal de référence et notamment en ce qu'ils sont dépourvus de réaction avec les lectines du sang.

8. Procédé de détection in vitro selon la revendication 5, caractérisé en ce que les anticorps reconnaissant la PAP humaine sont contenus dans un sérum polyclonal et en ce que la détection de complexes PAP-anticorps est réalisée à l'aide d'un sérum polyclonal contenant des anticorps anti-PAP marqués, par exemple biotinylés.

9. Procédé de détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une affection pancréatique liée à une mutation hétérozygote pour le gène CFTR selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

- la mise en contact d'une quantité déterminée d'un échantillon biologique, par exemple d'un échantillon de sang ou de sérum dans lequel on recherche la PAP, avec un anticorps monoclonal (dit "anticorps de capture") reconnaissant spécifiquement la PAP humaine, dans des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre l'anticorps de capture et la PAP lorsqu'elle est présente dans l'échantillon dosé,

- la mise en contact du milieu de réaction obtenu à l'étape précédente, avec un anticorps monoclonal (dit "anticorps de révélation") reconnaissant un épitope différent de l'épitope reconnu par l'anticorps de capture, l'anticorps de révélation étant marqué dans



des conditions permettant la formation d'un complexe immunologique entre l'anticorps de révélation et l'antigène préalablement lié à l'anticorps de capture,

- le lavage pour éliminer les anticorps de révélation n'ayant pas réagi,

- la détection des complexes anticorps de capture - antigène PAP - anticorps de révélation,

- la détermination de la concentration de PAP, et le cas échéant sa comparaison avec une médiane calculée pour un groupe déterminé d'échantillons de référence préalablement soumis au même dosage de la PAP dans les mêmes conditions.

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que l'anticorps de révélation est couplé à la peroxydase de raifort.

11. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 et 10, caractérisé en ce que l'anticorps de révélation est remplacé par ses fragments  $F(ab')_2$  ou Fab'.

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce que l'anticorps de capture est l'anticorps 6F3E4 produit par l'hybridome déposé à l'ECACC sous le numéro 92122310, le 23 Décembre 1992.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 12, caractérisé en ce que l'anticorps de révélation est l'anticorps 16F4B8 produit par l'hybridome déposé à l'ECACC sous le numéro 92122309, le 23 Décembre 1992.

14. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les anticorps monoclonaux de révélation et de capture, sont remplacés par des sérums polyclonaux reconnaissant la PAP humaine.

15. Anticorps monoclonal, caractérisé en ce qu'il reconnaît la PAP humaine naturelle purifiée et/ou

recombinante, lorsqu'il est adsorbé sur un support solide.

16. Anticorps monoclonal selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il s'agit de l'anticorps 6F3E4 ou de l'anticorps 16F4B8.

17. Kit comprenant au moins deux anticorps monoclonaux dirigés spécifiquement contre des épitopes différents de la PAP humaine, l'un au moins des deux anticorps (anticorps de capture) monoclonaux reconnaissant la PAP humaine lorsqu'il est fixé sur un support solide.

18. Kit pour la détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une affection pancréatique associée à une mutation hétérozygote pour le gène CFTR comprenant :

- des anticorps monoclonaux selon la revendication 15 ou 16, l'un de ces anticorps (anticorps de révélation) étant marqué,
- un réactif permettant de révéler l'anticorps de révélation,
- un témoin négatif.

19. Kit pour la détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une affection pancréatique associée à une mutation hétérozygote pour le gène CFTR comprenant :

- un sérum polyclonal reconnaissant la PAP humaine,
- le cas échéant un sérum polyclonal reconnaissant la PAP humaine, dont les anticorps sont marqués,
- un réactif permettant de révéler les anticorps marqués,
- un témoin négatif.

20. Utilisation d'anticorps monoclonaux reconnaissant spécifiquement la PAP humaine ou de sérums polyclonaux reconnaissant la PAP humaine pour

la détection in vitro de la mucoviscidose, ou d'une affection pancréatique associée à une mutation hétérozygote pour le gène CFTR.

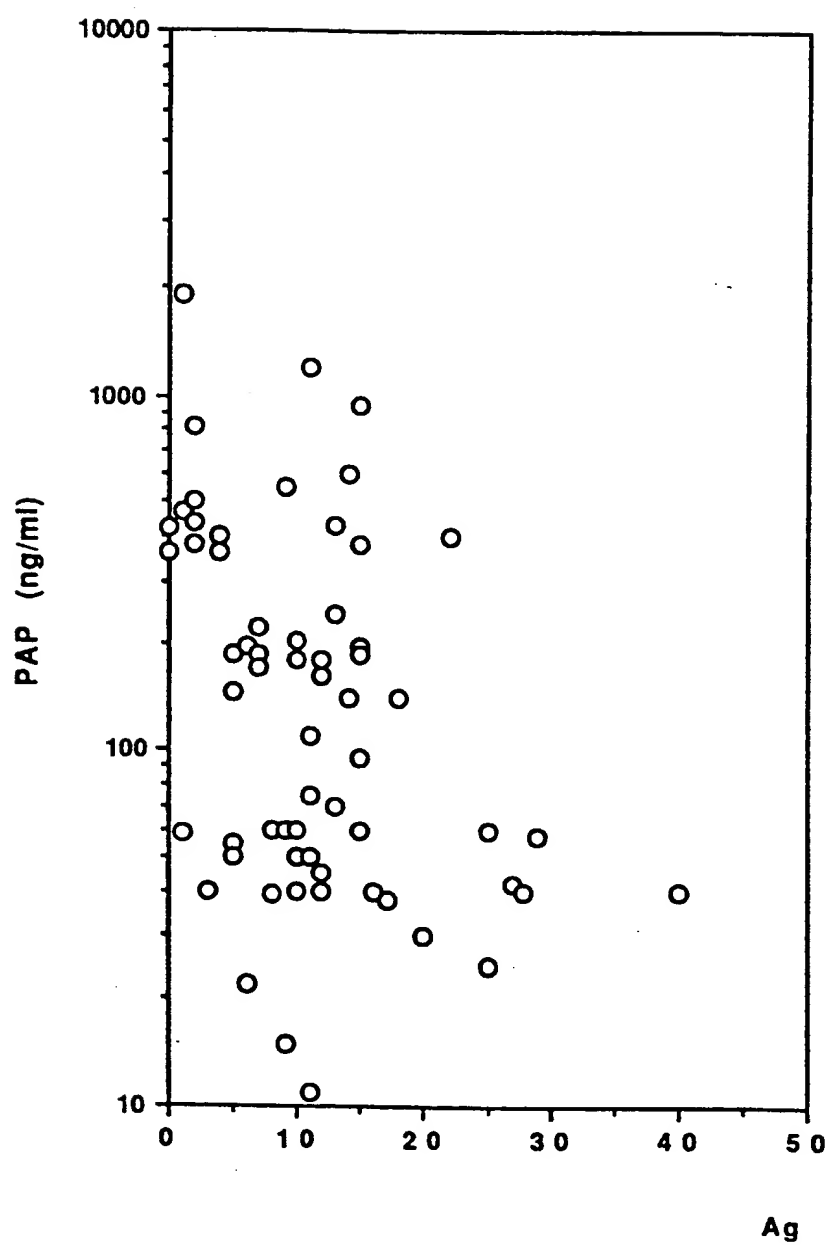


Figure 1

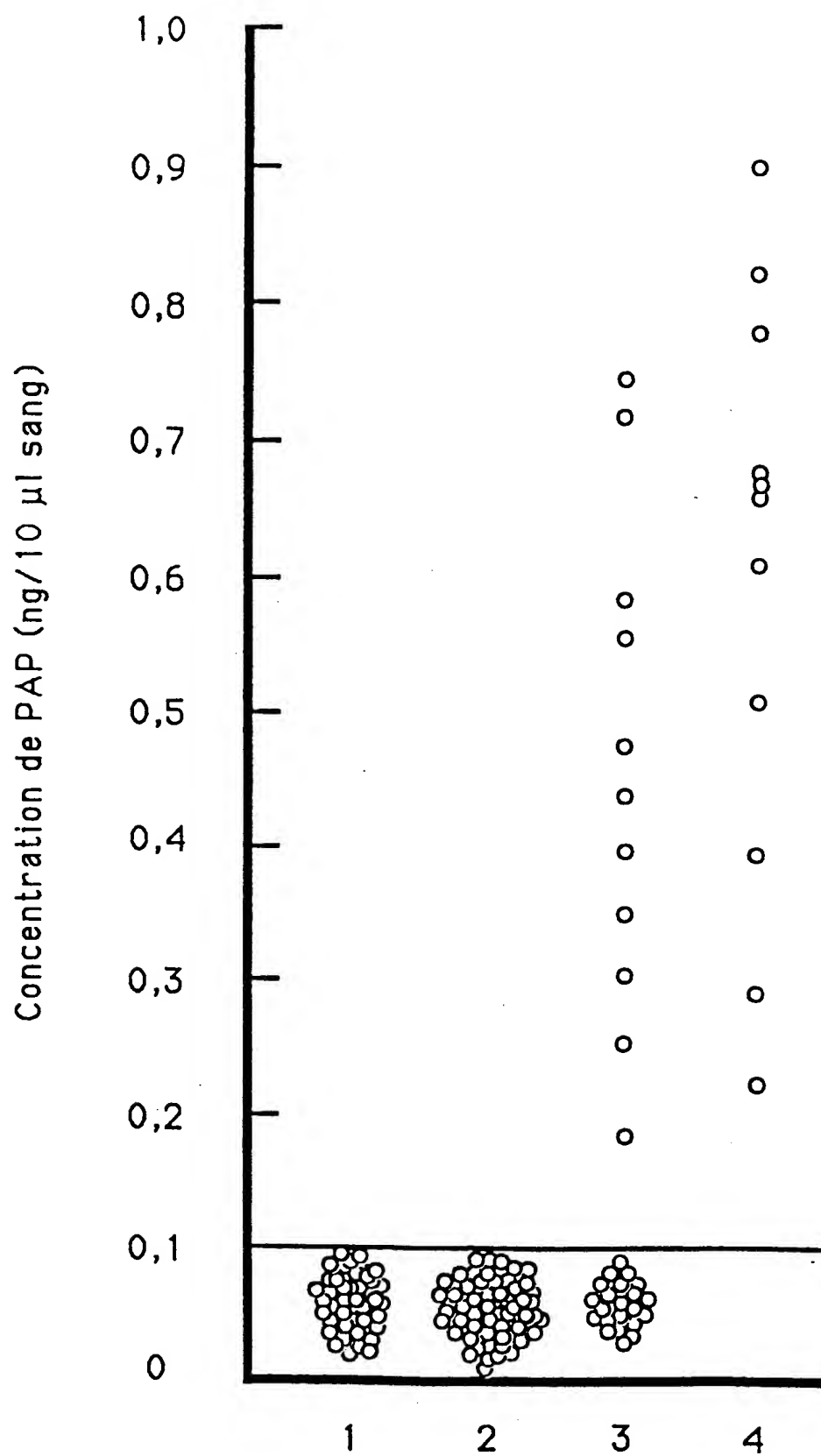


Figure 2

cgggagagtgactcctgattgcctcctcaagtcgcagacact	ATG	CTG	48
	Met	Leu	2
CCT CCC ATG GCC CTG CCC AGT GTA TCT TGG ATG CTG CTT			87
Pro Pro Met Ala Leu Pro Ser Val Ser Trp Met Leu Leu			15
TCC TGC CTC ATG CTG CTG TCT CAG GTT CAA GGT GAA GAA			126
Ser Cys Leu Met Leu Leu Ser Gln Val Gln Gly Glu Glu			28
CCC CAG AGG GAA CTG CCC TCT GCA CGG ATC CGC TGT CCC			165
Pro Gln Arg Glu Leu Pro Ser Ala Arg Ile Arg Cys Pro			41
AAA GGC TCC AAG GCC TAT GGC TCC CAC TGC TAT GCC TTG			204
Lys Gly Ser Lys Ala Tyr Gly Ser His Cys Tyr Ala Leu			54
TTT TTG TCA CCA AAA TCC TGG ACA GAT GCA GAT CTG GCC			243
Phe Leu Ser Pro Lys Ser Trp Thr Asp Ala Asp Leu Ala			67
TGC CAG AAG CGG CCC TCT GGA AAC CTG GTG TCT GTG CTC			282
Cys Gln Lys Arg Pro Ser Gly Asn Leu Val Ser Val Leu			80
AGT GGG GCT GAG GGA TCC TTC GTG TCC TCC CTG GTG AAG			321
Ser Gly Ala Glu Gly Ser Phe Val Ser Ser Leu Val Lys			93
AGC ATT GGT AAC AGC TAC TCA TAC GTC TGG ATT GGG CTC			360
Ser Ile Gly Asn Ser Tyr Ser Tyr Val Trp Ile Gly Leu			106
CAT GAC CCC ACA CAG GGC ACC GAG CCC AAT GGA GAA GGT			399
His Asp Pro Thr Gln Gly Thr Glu Pro Asn Gly Glu Gly			119
TGG GAG TGG AGT AGC AGT GAT GTG ATG AAT TAC TTT GCA			438
Trp Glu Trp Ser Ser Ser Asp Val Met Asn Tyr Phe Ala			132
TGG GAG AGA AAT CCC TCC ACC ATC TCA AGC CCC GGC CAC			477
Trp Glu Arg Asn Pro Ser Thr Ile Ser Ser Pro Gly His			145
TGT GCG AGC CTG TCG AGA AGC ACA GCA TTT CTG AGG TGG			516
Cys Ala Ser Leu Ser Arg Ser Thr Ala Phe Leu Arg Trp			158
AAA GAT TAT AAC TGT AAT GTG AGG TTA CCC TAT GTC TGC			555
Lys Asp Tyr Asn Cys Asn Val Arg Leu Pro Tyr Val Cys			171
AAG TTC ACT GAC tagtgcaggagggaagtcagcagcctgtgtttggt			602
Lys Phe Thr Asp			175
gtgcaactcatcatgggcatgagaccagtgtaggactcaccctggaagaga			654
atattcgcttaattcccccaacctgaccacctcattcttatctttcttctgt			706
ttcttcctccccgctagtcatttcagttcttcttattttgtcatacggcctaa			758

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 93/01299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
 IPC 5 G01N33/68 C07K15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 G01N C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,91 16428 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 31 October 1991 cited in the application see the whole document ---	1,4-7, 14,15, 17-20
X	GASTROENTEROLOGY vol. 103, no. 1, July 1992 pages 248 - 254 V.KEIM ET AL. 'A Novel Exocrine Protein Associated With Pancreas Transplantation in Humans.' cited in the application see the whole document ---	1,4,5,8
-/--		

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

\*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

\*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

\*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

\*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

11 March 1994

Date of mailing of the international search report

31.03.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentaan 2

Authorized officer

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No  
PCT/FR 93/01299

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US,A,4 322 274 (G.B.WILSON ET AL.) 30 March 1982  see the whole document ----	1,4-8, 14,15, 17-20
A	PEDIATRIC PULMONOLOGY vol. 7 , 1991 pages 11 - 18 P.M.FARRELL ET AL. 'Current Issues in Neonatal Screening for Cystic Fibrosis and Implications of the CF Gene Discovery.' cited in the application see the whole document ----	1
A	WO,A,91 02796 (HSC RESEARCH DEVELOPMENT CORPORATION) 7 March 1991 see page 1 - page 10 ----	1
A	EP,A,0 446 017 (GENZYME CORPORATION) 11 September 1991 see page 2 - page 3 -----	1



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 93/01299

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9116428	31-10-91	FR-A- 2661187 EP-A- 0528932	25-10-91 03-03-93
US-A-4322274	30-03-82	NONE	
WO-A-9102796	07-03-91	AU-A- 6161690 CA-A- 2066204 EP-A- 0489058 JP-T- 5500306 US-A- 5240846	03-04-91 23-02-91 10-06-92 28-01-93 31-08-93
EP-A-0446017	11-09-91	NONE	

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Dem. Internationale No  
PCT/FR 93/01299

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 5 G01N33/68 C07K15/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 5 G01N C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO,A,91 16428 (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 31 Octobre 1991 cité dans la demande voir le document en entier ---	1,4-7, 14,15, 17-20
X	GASTROENTEROLOGY vol. 103, no. 1, Juillet 1992 pages 248 - 254 V.KEIM ET AL. 'A Novel Exocrine Protein Associated With Pancreas Transplantation in Humans.' cité dans la demande voir le document en entier ---	1,4,5,8
	-/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*..\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 Mars 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

31.03.94

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Fonctionnaire autorisé